

令和 6 年 6 月 13 日現在

機関番号：13101

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2022～2023

課題番号：22K20911

研究課題名（和文）近赤外線自家蛍光粒子に着目した動脈硬化プラークの質的診断法および治療法の開発

研究課題名（英文）Development of diagnostic and therapeutic approach for vulnerable atherosclerotic plaques focusing on near infrared autofluorescent particles

研究代表者

池上 龍太郎（Ikegami, Ryutaro）

新潟大学・医歯学系・助教

研究者番号：20815360

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,200,000円

研究成果の概要（和文）：本研究は、培養マクロファージに酸化LDLを添加して作成した自家蛍光発生細胞を用いて、不安定プラークにおける自家蛍光発生メカニズムについて検証した。自家蛍光発生マクロファージではリソソーム機能が低下していた。リソソーム機能阻害薬で自家蛍光は増強し、リソソーム賦活化薬によって減弱することが示された。本研究の成果より、泡沫化マクロファージにおける自家蛍光の発生は、脂質過負荷によるリソソーム機能低下に伴う細胞恒常性の破綻が原因であり、プラーク中の自家蛍光は細胞死に向かう機能不全マクロファージの存在を反映して、壊死性コアの検出に有用であることが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

不安定プラークの診断法の開発は冠動脈疾患の大きなアンメットニーズである。米国で開発中である血管内分子イメージングデバイスNIRAF-OCTは、不安定プラークから発生する自家蛍光を検出しプラークの脆弱性を診断するというものであり、今後の臨床応用が期待されている。本研究は、不安定プラーク内に存在する泡沫化マクロファージがリソソーム機能不全を起こし細胞死に至る過程で自家蛍光を発生させていることを明らかとした。自家蛍光はプラーク不安定化に重要な壊死性コアの形成を反映していると考えられ、NIRAF-OCTによる自家蛍光検出の診断的意義を確立することができた。

研究成果の概要（英文）：This study explored the mechanism of autofluorescence generation in vulnerable plaque using autofluorescence-generating cells prepared by adding oxidised LDL to cultured macrophages. Autofluorescence-generating macrophages demonstrated lysosomal dysfunction. Autofluorescence was shown to be enhanced by lysosome function inhibitors and attenuated by lysosome activating drugs. The results indicate that autofluorescence in foamy macrophages is due to a disruption of cellular homeostasis associated with lysosomal dysfunction, and that autofluorescence in plaques reflects the localization of necrotic core relating to dysfunctional macrophages that are headed towards cell death.

研究分野：動脈硬化

キーワード：不安定プラーク 分子イメージング 泡沫化マクロファージ 自家蛍光 血管内イメージング

1. 研究開始当初の背景

近年、虚血性心疾患の領域において、動脈硬化プラークの安定性を評価し、破綻リスクに応じた治療戦略を立てることのニーズが高まっている。“プラークの中身”を質的に診断する血管内分子イメージング技術として注目されているのが、近赤外線自家蛍光法 (NIRAF: Near infrared autofluorescence) を用いた NIRAF-OCT である (図 1)。NIRAF-OCT は米国の研究チームが開発した血管内イメージングデバイスであり、プラークが不安定化に伴って発する自家蛍光を検出することでプラークの質的診断を可能にするというものである。臨床応用を目指した取り組みが進む一方で、不安定プラークが自家蛍光を発する分子メカニズムについては不明な点が多い。我々は、プラーク内に存在する泡沫化マクロファージが自家蛍光を発することに着目し、自家蛍光とプラーク不安定化のメカニズムについて研究を行ってきた。

2. 研究の目的

本研究課題の目的は、不安定プラークに存在する自家蛍光粒子の発生メカニズムと病態的意義を明らかにすることで NIRAF-OCT に診断的意義を確立すること、また、自家蛍光の抑制を糸口とした新しいアプローチの動脈硬化治療法の開発を目指すことである。

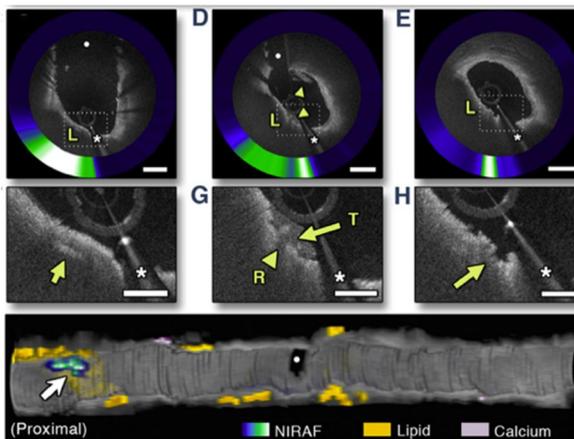


図 1. NIRAF-OCT

3. 研究の方法

ヒト単球細胞 (THP-1 細胞) をマクロファージに分化させた後、酸化 LDL (oxLDL) を添加して 2 日間培養すると泡沫化マクロファージとなる。この時点では自家蛍光は発生しないが、さらに 3 日間培養を継続することでマクロファージ内に自家蛍光粒子が観察されるようになる (図 2)。この In vitro NIRAF モデルを用いて、以下の検証を行った。

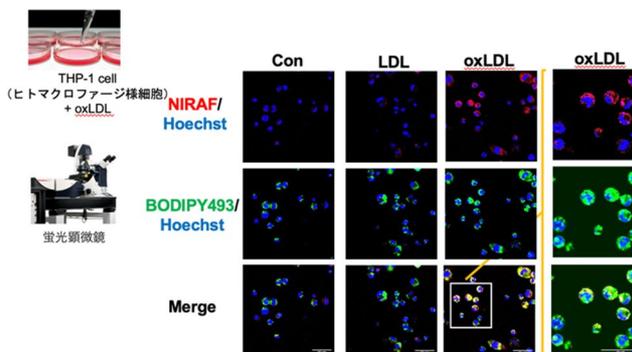


図 2. 自家蛍光を発生する泡沫化マクロファージ

(1) 自家蛍光発生マクロファージの特性解析

自家蛍光発生マクロファージ (oxLDL 添加 5 日目) と非発生マクロファージ (oxLDL 添加 2 日目) の炎症マーカー等の発現をリアルタイム PCR で比較する。細胞死や細胞活動性について評価する。

(2) リソソーム機能不全と自家蛍光の関連

自家蛍光発生マクロファージにおけるリソソーム関連蛋白の発現、リソソーム機能を検証した。

(3) 自家蛍光に着目した治療応用への可能性の検証

自家蛍光は泡沫化マクロファージにおけるリソソーム機能不全を反映しているという結果を踏まえ、リソソーム機能賦活化により自家蛍光が減弱するかを検証し、不安定プラークの治検につながる可能性があるか検証する。

4. 研究成果

(1) 自家蛍光発生マクロファージの特性解析

炎症性サイトカインの mRNA の発現について、リアルタイムで解析した。oxLDL を添加し 2 日間培養した泡沫化マクロファージでは TNF- α やインターロイキン 1b などの炎症性サイトカインの mRNA の発現が上昇していたのに対し、oxLDL 添加して 5 日培養し自家蛍光を発生させた細胞では、これらの発現は低下していた。泡沫化マクロファージは炎症性サイトカインを分泌し周囲の炎症を惹起することが知られているが、自家蛍光陽性となった泡沫化マクロファージは炎症応答のピークを過ぎ、活動性が低下しているフェーズにあると考えられた。Viability/Cytotoxicity Multiplex Assay Kit を用いた cell viability の評価では、自家蛍光発生マクロファージにおいて細胞活動性が顕著に低下しており、泡沫化マクロファージが細胞死に向かいつつある過程で、自家蛍光が発生していることが明らかとなった。

(2) リソソーム機能不全と自家蛍光の関連

自家蛍光発生マクロファージのリソソームを分子蛍光プローブで染色したとこと、高い頻度で自家蛍光粒子と共局在することが明らかとなった(図3)。このことから、自家蛍光のかなりの部分がリソソームから発生していることがわかった。リソソーム pH 検出キットを用いた検証では、自家蛍光発生細胞におけるリソソーム pH は上昇していた。したがって、自家蛍光発生泡沫化マクロファージでは、非発生細胞に比べ、リソソーム機能不全がさらに進行していることがわかった。

マクロファージにおけるリソソーム機能不全は分解不良産物の蓄積を招き、やがて細胞恒常性の破綻につながる。実際、細胞内の酸化脂質の蓄積を酸化脂質検出分子プローブで評価すると、自家蛍光発生マクロファージでは有意に酸化脂質の蓄積がおこっていることがわかった(図4)。また、マロンジアルデヒドや 4-hydroxynonenal などの脂質過酸化物の蓄積が観察された。マクロファージにおいて、取り込まれた脂質はリソソームで分解されるが、自家蛍光発生マクロファージではリソソーム機能不全により脂質分解が起こらず、消化不全の酸化脂質が蓄積し、蛋白などと結合して複合体を形成していると考えられた。自家蛍光はマクロファージにおけるリソソーム機能不全を反映していると考えられる。

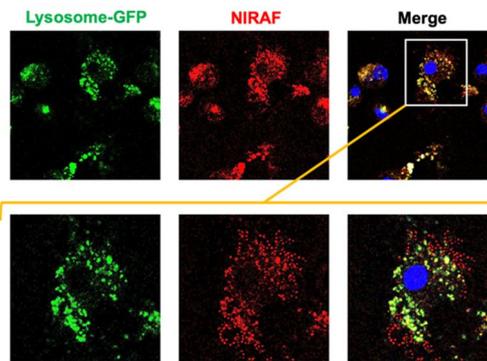
(3) 自家蛍光に着目した治療応用への可能性の検証

リソソーム機能不全の指標となる自家蛍光の検出は、プラークにおけるマクロファージの恒常性破綻と細胞死に向かう過程を反映し、壊死性プラークの形成過程を検出できていると考えられる。すなわち、自家蛍光シグナルの亢進はプラーク内マクロファージの細胞機能の低下と捉えることができる。そこで、リソソーム機能賦活化薬が自家蛍光の発生を抑制しうるかを検証した。oxLDL と一緒に

リソソーム賦活化薬を添加して 5 日間培養すると自家蛍光の発生は有意に抑制された(図5)。逆にリソソーム阻害薬を添加すると自家蛍光発生は亢進し、細胞死も誘導された。以上より、リソソーム賦活化薬は脂質過負荷により引き起こされるリソソームの機能不全の進行を抑制できる可能性がある。自家蛍光に着目することでプラーク内マクロファージ機能を介入点とした新しいアプローチの動脈硬化治療の可能性につながるものである。

< 結論 >

泡沫化マクロファージにおいて脂質の過負荷はリソソーム機能不全を誘導し、分解能低下から酸化脂質の蓄積を招く。これらが自家蛍光の発生源となっている。したがって、自家蛍光の発生はプラーク内におけるマクロファージの細胞恒常性破綻から細胞死に至る過程を反映しており、NIRAF-OCT は壊死性コアの検出に有効であると考えられる。リソソーム賦活化薬は自家蛍光を抑制し、マクロファージの機能維持を介して脂質蓄積を防ぐと考えられ、新しい動脈硬化治療へのアプローチになる可能性がある(図6)。



Lipid peroxidation sensor

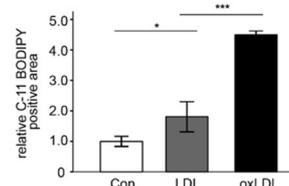
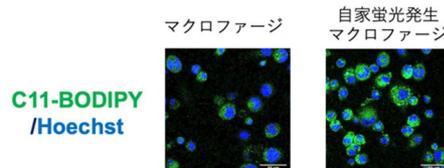


図4. 自家蛍光発生細胞内にみられる酸化脂質

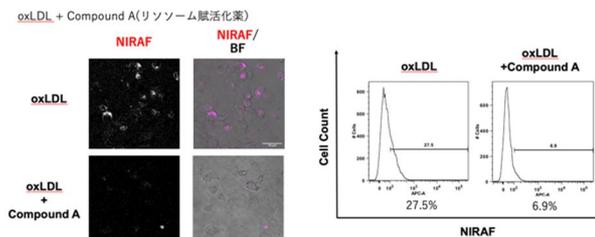


図5. リソソーム賦活化による自家蛍光の減弱

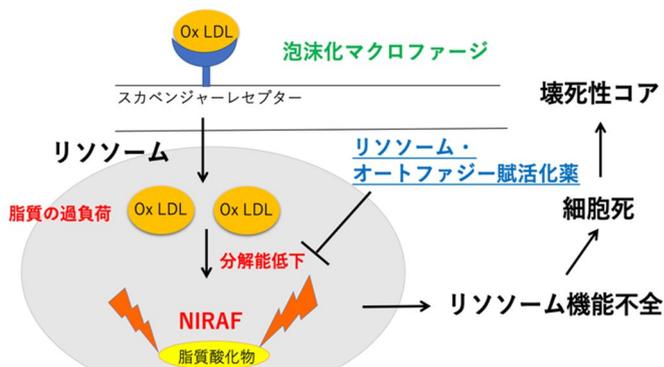


図6. 不安定プラークにおける自家蛍光の病的意義

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 0件）

| | |
|---|---------------------------|
| 1. 著者名 Ikegami Ryutarō, Piao Zhonglie, Iglesias Juan F., Pilgrim Thomas, Ha Khanh, McCarthy Jason R., Castellanos Maria I., Kassab Mohamad B., Albagdadi Mazen S., Mauskapf Adam, Spicer Graham, Kandzari David E., Edelman Elazer R., Libby Peter, Heg DiK, Joner Michael, Tearney Guillermo J., Jaffer Farouc A. | 4. 巻 20 |
| 2. 論文標題 Ultrathin-strut versus thin-strut stent healing and outcomes in preclinical and clinical subjects | 5. 発行年 2024年 |
| 3. 雑誌名 EuroIntervention | 6. 最初と最後の頁 e669 ~ e680 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.4244/EIJ-D-23-00563 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難 | 国際共著 該当する |
| 1. 著者名 Hoyano Makoto, Ozaki Kazuyuki, Kubota Naoki, Yoneyama Shintaro, Okubo Takeshi, Ikegami Ryutarō, Inomata Takayuki | 4. 巻 - |
| 2. 論文標題 Coronary Aneurysm after Excimer Laser Catheter Ablation and Plain Balloon Angioplasty for Chronic Total Occlusion in a Patient with Kawasaki Disease | 5. 発行年 2024年 |
| 3. 雑誌名 Internal Medicine | 6. 最初と最後の頁 - |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2169/internalmedicine.3210-23 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難 | 国際共著 - |
| 1. 著者名 Yoneyama Shintaro, Kubota Naoki, Ozaki Kazuyuki, Okubo Takeshi, Ikegami Ryutarō, Hoyano Makoto, Inomata Takayuki | 4. 巻 87 |
| 2. 論文標題 Angioscopic Findings of Calcification in Saphenous Vein Graft | 5. 発行年 2023年 |
| 3. 雑誌名 Circulation Journal | 6. 最初と最後の頁 1705 ~ 1705 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1253/circj.CJ-23-0421 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難 | 国際共著 - |
| 1. 著者名 Akiyama Takumi, Ozaki Kazuyuki, Takano Toshiki, Yoneyama Shintaro, Kubota Naoki, Okubo Takeshi, Ikegami Ryutarō, Hoyano Makoto, Yanagawa Takao, Inomata Takayuki | 4. 巻 62 |
| 2. 論文標題 Efficacy of Proprotein Convertase Subtilisin/Kexin Type 9 Inhibitor Treatment for Repeated In-stent Restenosis in a Coronary Artery | 5. 発行年 2023年 |
| 3. 雑誌名 Internal Medicine | 6. 最初と最後の頁 3361 ~ 3365 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2169/internalmedicine.1609-23 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難 | 国際共著 - |

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

| |
|---|
| 1. 発表者名 秋山琢洋、池上龍太郎、久保田直樹、米山晋太郎、高野俊樹、大久保健志、保屋野真、尾崎和幸、猪又孝元 |
| 2. 発表標題 Serum Apolipoprotein-A2 Levels are a Stronger Predictor of the Residual Cardiovascular Event Risk After Percutaneous Coronary Intervention |
| 3. 学会等名 第88回日本循環器学会学術集会 |
| 4. 発表年 2024年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 Takumi Akiyama, Ikegami Ryutaro, Naoki Kubota, Toshiki Takano, Shintaro Yoneyama, Takeshi Okubo, Makoto Hoyano, Kazuyuki Ozaki, Takayuki Inomata |
| 2. 発表標題 Serum Apolipoprotein-A2 Levels are a Stronger Predictor of the Residual Cardiovascular Event Risk after Percutaneous Coronary Intervention |
| 3. 学会等名 American Heart Association annual meeting 2023 (国際学会) |
| 4. 発表年 2023年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 池上龍太郎 |
| 2. 発表標題 Near-Infrared autofluorescence in atherosclerosis generated by oxidized lipid associated with lysosome dysfunction |
| 3. 学会等名 第87回日本循環器学会学術集会 |
| 4. 発表年 2022年 |

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

| 氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号) | 所属研究機関・部局・職 (機関番号) | 備考 |
|---------------------------|-----------------------|----|
|---------------------------|-----------------------|----|

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

| 共同研究相手国 | 相手方研究機関 |
|---------|---------|
|---------|---------|